

**ANTIKÖRPER GEGEN BORDETELLA PERTUSSIS  
BEI PATIENTEN MIT AKUTEN INFEKTEN  
UND BEI GEIMPFTEN PATIENTEN.**

**NACHWEIS VON IgG-, IgA- UND IgM-ANTIKÖRPERN  
MIT HILFE EINES NEUENTWICKELTEN  
ELISA-TESTVERFAHRENS.**

**Ingrid Anna Dicklhuber**



Aus der Kinderklinik der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. H. B. Hadorn

ANTIKÖRPER GEGEN BORDETELLA PERTUSSIS BEI  
PATIENTEN MIT AKUTEN INFEKTEN UND BEI GE-  
IMPFTEN PATIENTEN.  
NACHWEIS VON IgG-, IgA- UND IgM-ANTIKÖRPERN  
MIT HILFE EINES NEUENTWICKELTEN  
ELISA-TESTVERFAHRENS.

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Ingrid Anna Dicklhuber  
aus  
Passau  
Jahr  
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Feller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. B. Hadorn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dez. 1986

## Inhaltsverzeichnis

|                              | Seite |
|------------------------------|-------|
| A. Einleitung                | 2     |
| B. Zweck und Ziel der Arbeit | 9     |
| C. Probanden und Methodik    | 11    |
| 1. Probanden                 | 11    |
| 2. Methodik                  | 13    |
| a) Materialien               | 13    |
| b) Versuchsanordnung         | 14    |
| D. Ergebnisse                | 18    |
| E. Diskussion                | 37    |
| F. Zusammenfassung           | 42    |
| G. Literaturverzeichnis      | 44    |
| Danksagung                   |       |
| Lebenslauf                   |       |



## A. Einleitung

Pertussis ist eine kontagiöse Infektionskrankheit, die durch charakteristische, anfallsweise auftretende, krampfartige Hustenattacken gekennzeichnet ist.

Der Erreger dieser Infektionskrankheit, das Bakterium *Bordetella pertussis* wurde 1906 von Bordet und Gengou erstmals angezüchtet. Pertussisähnliche Krankheitsbilder werden auch von *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchisepticum* und von einigen Viren hervorgerufen. Hier sind besonders das Respiratory-Syncytial-Virus, die Gruppe der Parainfluenza- und der Adenoviren aufzuführen (7).

*Bordetella pertussis* ist ein gramnegatives, unbewegliches, nichtsporenbildendes Stäbchenbakterium, das früher zur Familie der Parvobakterien gerechnet wurde. Das 0,2 - 0,3  $\mu$ m dicke und 1  $\mu$ m lange Bakterium kann nur auf Spezialnährböden bei einer Temperatur von 35 °C - 37 °C unter aeroben Bedingungen kultiviert werden.

Die Keuchhustenerkrankung ist auf der ganzen Welt, in sämtlichen klimatischen Zonen, verbreitet. Der Mensch ist der einzige natürliche Wirt für *Bordetella pertussis*. Die Übertragung erfolgt durch Tröpfcheninfektion oder durch direkten Kontakt, wobei die Empfänglichkeit eines Menschen gegenüber dem Bakterium von vielen dispositionellen Faktoren beeinflusst wird. Daraus lassen sich auch die verschiedenartigen Verlaufsformen erklären. Dabei kommt es nicht immer zur Ausprägung des Vollbildes, vor allem im Erwachsenenalter werden abortive Formen beobachtet, während man bei Säuglingen häufig schwere Verläufe

sieht. Wie langfristige, weltweite Studien zeigen, sind Mädchen, besonders nach dem 10. Lebensjahr, stärker infektionsgefährdet als Jungen. Die Gefahr, an einer Keuchhustenkomplikation zu sterben, ist für Mädchen ebenfalls höher (16).

Die Bakterien, die mit Fibrinen zur Adhäsion ausgestattet sind, besiedeln zu Beginn der 10 - 21 Tage dauernden Inkubationszeit die Schleimhäute des Respirationstraktes und vermehren sich dort. Als Folge reagiert der Makroorganismus mit einer lokalen Hyperämie und einer Emigration von Leukozyten bzw. Lymphozyten in die Mukosa des Flimmerepithels.

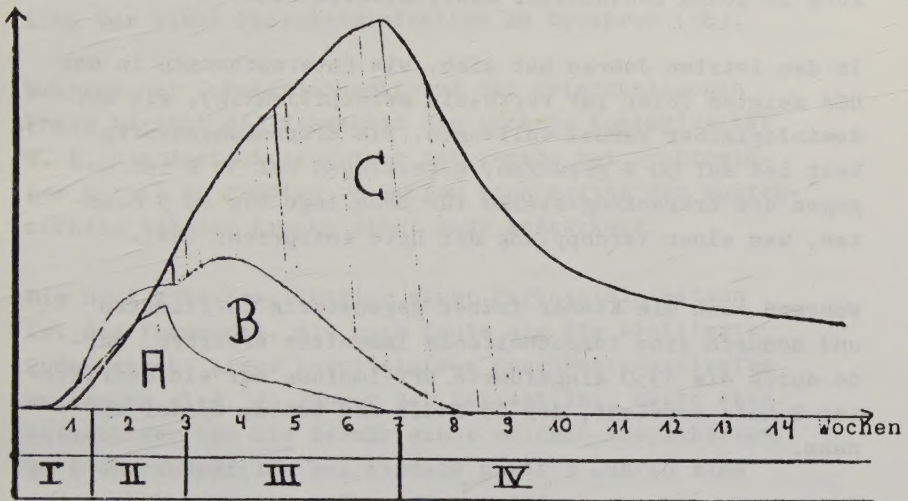
Nach Ablauf der Inkubationszeit bewirken die inzwischen gebildeten Toxine ein uncharakteristisches, katarrhalisches Initialstadium, das ca. 2 Wochen dauert.

Im Anschluß daran beginnt das sogenannte paroxysmale Stadium, das von schweren mit Konvulsionen einhergehenden Hustenattacken geprägt ist. Ein Anfall zeichnet sich durch stakkatoartige Hustenstöße während der Expirationsphase mit anschließender Reprise, d. h. ziehendem Inspirium aus. Die Patienten sind während des Anfalls meist zyanotisch. Nach einer Dauer von 2 - 3 Minuten kommt es im Anschluß an ein Expirium zum Hervorwürgen eines zähen, fadenziehenden Sputums, das von Erbrechen gefolgt sein kann.

Zwischen den Anfällen ist das Kind nicht allzu stark in seinem Allgemeinbefinden gestört. Es ist leicht reizbar, appetitlos und leidet an Schlafstörungen. Nach 2 - 4 Wochen lassen die Hustenanfälle nach, zuerst tagsüber, dann auch nachts. Das Stadium decrementi beginnt. Die Dauer

der Erholungsphase hängt von der Schwere der Krankheit ab und ist individuell verschieden.

Abbildung 1: Schematischer Verlauf einer Pertussisinfection nach Dieckhoff und Schneeweiss (6).



Legende:

- |                          |                           |
|--------------------------|---------------------------|
| A = Erregervermehrung    | I = Inkubationszeit       |
| B = Endotoxinfreisetzung | II = Stadium katarrhale   |
| C = Antikörperbildung    | III = Stadium paroxysmale |
|                          | IV = Stadium decrementi   |

Die Mehrzahl der Menschen machen ihre Pertussisinfection im Kindesalter durch. 80 % der Fälle entfallen auf die ersten 4 Lebensjahre, davon 61 % auf das erste Lebensjahr (2). Mit zunehmendem Alter sinkt das Erkrankungs-

risiko auf bis zu 8 % bei Personen über 20 Jahren ab (3). Da die Erkrankung eine jahrzehntelange Immunität hinterläßt und die Durchseuchung in Endemiegebieten bereits im frühen Kindesalter erfolgt, sind besonders ältere Menschen wieder infektionsgefährdet, obwohl sich die Erkrankung in jedem Lebensalter manifestieren kann.

In den letzten Jahren hat sich, wie Untersuchungen in den USA zeigten (hier ist Pertussis meldepflichtig), ein epidemiologischer Wandel vollzogen. Die Erkrankungshäufigkeit ist auf 50 % gesunken, angestiegen auf 30 % ist dagegen das Erkrankungsrisiko für Säuglinge bis zu 3 Monaten, was einer Verdopplung der Rate entspricht (24).

Während sich die Kinder früher gegenseitig infizierten und dadurch eine langanhaltende Immunität erwarben, wurde durch die 1950 eingeführte DFT-Impfung nur ein befristeter Schutz erreicht, der im Laufe des Lebens wieder abnahm.

Da die DFT-Impfung nur die Ausprägung der klinischen Krankheitszeichen, nicht jedoch die Keimbesiedelung verhindert, und, wie oben erwähnt, die Schutzwirkung im Laufe der Zeit nachzulassen beginnt, können junge Erwachsene klinisch nicht manifeste Pertussisinfectionen durchmachen und dadurch zu Ansteckungsquellen für Säuglinge und Kleinkinder werden (16, 24).

Dieser bedrohliche Wandel im Ansteckungsmodus wird noch dadurch unterstrichen, daß 40 % aller durch Pertussis verursachten Todesfälle auf Säuglinge unter 5 Monaten entfallen, die naturgemäß durch engen Kontakt mit Erwachsenen, besonders der Mutter, sehr ansteckungsgefährdet

sind (16).

Dieser Umstand läßt die Folgerung zu, daß keine oder nur sehr wenig Antikörper der IgG-Klasse von der Mutter auf diaplazentarem Weg auf den Embryo übertragen werden, die in ihrer Schutzwirkung nicht ausreichen, den Säugling vor einer Pertussisinfection zu bewahren (16).

Während der Inkubationszeit und der katarrhalischen Phase besitzt die Krankheit die höchste Kontagiosität, d. h. die Ansteckungsgefahr ist gerade bei symptomloser Klinik am größten. 3 Wochen nach Beginn der Hustenfälle ist der Kranke nicht mehr ansteckend.

Die häufigste Komplikation einer Pertussisinfection ist die Pneumonie, die noch heute als die wichtigste Todesursache eines komplizierten Keuchhustenverlaufes angesehen wird. Je jünger der Patient ist, desto eher besteht für ihn die Gefahr einer solchen Komplikation. 90 % der Todesfälle bei Kindern unter 3 Jahren sind auf eine Pneumonie zurückzuführen (7).

Durch den Erreger und sein Toxin oder durch eine bakterielle Sekundärinfektion kommt es zu einer Verengung des Alveolarlumens durch interstitiell-proliferative Vorgänge in der Lunge und schließlich zu Atelektasen. Bei der Entstehung der Atelektasen wird auch eine Bronchusobstruktion durch den zähen Schleim diskutiert. Als Folge der Atelektasen können sich irreversible Bronchiektasen bilden (6).

Neben den Lungenaffektionen kann es auch zu einer Mitbeteiligung des Zentralnervensystems kommen. Die toxisch

bedingte Engstellung der kleinen Gefäße führt zu einer Hypoxie bzw. Ischämie des Gehirns. Diese Keuchhusten-enzephalopathie, die besonders häufig während der ersten Lebensjahre auftritt, äußert sich in generalisierten Krämpfen, Koma und neurologischen Ausfällen, besonders in Lähmungen der Extremitäten und Hirnnerven. Die Enzephalopathie hat eine hohe Letalität und hinterläßt in 50 % Dauerschäden, wie z. B. Charakterveränderungen (7).

Beim Säugling kann es aufgrund einer Alkalose, bedingt durch häufiges Erbrechen, zu Tetanien kommen. Eine weitere gefürchtete Komplikation im Säuglingsalter stellen die apnoischen Anfälle dar, bei denen es während der expiratorischen Hustenphase wegen der Unreife des Atemzentrums und des Hustenzentrums zu Fehlregulationen kommt (16).

Eine in den Jahren 1976 - 80 in Deutschland bei praktizierenden Kinderärzten durchgeführte Untersuchung zeigt, daß die Erkrankungshäufigkeit in diesem Zeitraum um das 4,6fache angestiegen ist. Als mögliche Ursache für diese langsam zunehmende Epidemie wird die in der Bundesrepublik Deutschland zurückgegangene Impfbereitschaft angesehen. Die durch die Schutzimpfung erlangte Immunität ist in Deutschland seit 1974 von 80 % auf 8 % abgesunken, da 1974 die öffentliche Empfehlung der Keuchhustenimpfung auf bestimmte Risikogruppen eingeengt wurde (10, 11).

Das Risiko, einen schweren neurologischen Schaden innerhalb der ersten 7 Tage nach einer DPT-Impfung zu bekommen, wird für den Einzelnen mit 1 : 110 000 angegeben. Dauerschäden, die länger als 1 Jahr persistieren,

treten mit einer Häufigkeit von 1 : 310 000 auf (23).

Die Gefahr, einen zusätzlichen neurologischen Schaden durch eine dreimalige DPT-Impfung zu induzieren, ist auch für geistig retardierte Kinder und solche mit bereits vorhandenen neurologischen Ausfällen nicht signifikant höher, wie Untersuchungen in Großbritannien im Jahre 1983 zeigten (22).

Da die Verdachtsdiagnose Pertussis bisher meist aufgrund klinischer Parameter gestellt wurde und kein exakter laborchemischer Nachweis der Erkrankung möglich war, konnte man ähnliche Krankheitsbilder oft nicht voneinander trennen, und abortive Formen wurden nicht sicher erfaßt.

Der direkte Bakteriennachweis ist schwierig durchzuführen, da es sich bei *Bordetella pertussis* um ein anspruchsvolles Bakterium handelt, das sich nur auf Spezialnährböden anzüchten läßt (17).

Durch Isolierung des Bakteriums aus kombinierten Nasen-Rachenabstrichen zu Beginn der katarrhalischen Phase erzielt man die höchsten Erfolgsquoten, die jedoch unter 50 % liegen (17). Die Kolonien wachsen nach 2 - 3 Tagen in typischer Form als sogenannte "mercury drops". Der Nachweis gestaltet sich mit zunehmender Krankheitsdauer immer schwieriger und wird meistens 2 - 3 Wochen nach Beginn des Stadium katarrhale unmöglich (20).

Der direkte Antigennachweis mit Immunfluoreszenzmethoden aus Nasen-Rachenabstrichen erwies sich als unspezifisch und brachte bis zu 40 % falsch positive Ergebnisse (4).

Die Doppelimmundiffusionstechnik nach Ouchterlony zum Nachweis präzipitierender Antikörper zeigt sich der Bakterienagglutination mit 86 % gegenüber 53 % bei Patienten mit kulturellem Nachweis von *Bordetella pertussis* überlegen. Die Nachteile der Technik nach Ouchterlony liegen in einer verhältnismäßig langen Testlaufzeit von ca. 10 Tagen und darin, daß man gepaarte Seren benötigt (1).

In Schweden und Finnland begann man 1982 zirkulierende Antikörper gegen Pertussis mit dem Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) nachzuweisen. Dabei zeichnete sich schon bald ab, daß hiermit ein hochsensibles Verfahren gefunden worden war, daß sowohl der Bakterienagglutination, der Komplementbindung als auch dem direkten Bakteriennachweis überlegen ist (29).

### B. Zweck und Ziel der Arbeit

Um die Verdachtsdiagnose Pertussis zu sichern, mußte man bisher den krankheitstypischen Verlauf abwarten und klinische Parameter wie Leukozytose mit Lymphozytose berücksichtigen. Die Erkrankung wurde dadurch meist erst im paroxysmalen Stadium erkannt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Infektionsgefahr, die im katarrhalischen Stadium am größten ist, wieder abgesunken, und eine Isolierung gegenüber gefährdeten Kindern kommt zu spät.

Ein Nachteil der bisher verwendeten serologischen Methoden, wie z. B. der Komplementbindung, der Bakterienagglutination oder des indirekten Hämagglutinationstests, ist

deren geringe Sensitivität und die Tatsache, daß gepaarte, d. h. zwei in zeitlichem Abstand gewonnene Seren notwendig waren, was mit einer schnellen Routinediagnostik nicht vereinbar war (26).

Atypische oder abortive Formen wurden oft übersehen. Nach einer DPT-Impfung in der Kindheit kommt es durch die vorhandene Immunitätslage bei Infektion mit *Bordetella pertussis* zu einer modifizierten Ausbreitung des Bakteriums und somit zu atypischen Keuchhustenerkrankungen. In diesen Fällen und bei pertussisähnlichen Krankheitsbildern anderer Ätiologie ist eine abgrenzende Diagnostik, wie sie mit dem für Pertussis spezifischen ELISA-Test möglich ist, für eine effektive Behandlung von großer Bedeutung. Nur bei Patienten, die an einer durch *Bordetella pertussis* bzw. *parapertussis* verursachten Infektion erkrankt sind, finden sich hohe Antikörpertiter im Serum, nicht jedoch bei klinisch ähnlichen Krankheitsbildern, die durch andere Erreger verursacht wurden.

Der ELISA-Test ermöglicht durch Verwendung verschiedener Enzymkonjugate, welche sicher nur an eine Immunglobulinklasse binden, den selektiven Nachweis von Antikörpern und deren quantitative Bestimmung. Dadurch kann man bereits im katarrhalischen Stadium eine gezielte Diagnostik betreiben, da Antikörper der IgM- und IgA-Klasse bereits während der akuten Phase nachweisbar sind (29).

1982 zeigten Untersuchungen in Finnland, daß der ELISA-IgM-Test die Anforderungen, die an eine schnell verfügbare Methode gestellt werden, erfüllt, da zur Durchfüh-

rung des Tests nur eine einzige Serumprobe notwendig ist (29).

Gegenüber anderen serologischen Methoden kommt der ELISA-Test mit geringen Serummengen aus und weist eine 10 - 100 Mal höhere Empfindlichkeit auf, die im Bereich von  $10^{-18}$  Mol liegt (5, 25).

Aufgrund dieser Tatsache ist es möglich, den Nachweis der schwachen Antikörperreaktion bei Kindern unter 6 Monaten zu erbringen (27). Durch den Nachweis von IgM-Antikörpern im Serum von Säuglingen kann man eine akute Infektion aufzeigen, da IgM-Antikörper nicht auf plazentarem Weg übertragen werden (9).

Der große Vorteil des ELISA-Tests liegt in seiner hohen Empfindlichkeit. Voraussetzung für diese sensitive Antikörpernachweismethode ist die Verwendung eines Antigens, das die zu bestimmenden Antikörper binden kann. Ein von der Fa. Behring primär als Impfstoff entwickeltes Antigen aus extrahierten Bakterienmembranen, das die Bildung von Antikörpern zu induzieren vermag, erwies sich als sehr gut geeignet, die im Serum zirkulierenden Antikörper zu binden (12).

## C. Probanden und Methodik

### 1. Probanden

Aus dem Krankengut der Universitätskinderklinik in München aus den Jahren 1982/83 wurden 80 Probanden ausgewählt, die entweder einen unklaren Infekt der oberen

Luftwege, eine pertussisverdächtige Symptomatik aufwiesen oder die 3 DPT-Impfungen erhalten hatten.

Altersverteilung und Einordnung der Patienten nach oben aufgeführten Kriterien siehe Tabelle 1:

Tabelle 1: Aufschlüsselung der Patienten nach Alter und Diagnose

| Alter      | Anzahl d. Pat.<br>mit Pert.verdacht | Anzahl d. Pat.<br>mit unklarem Infekt der oberen<br>Luftwege | Anzahl d. Pat.<br>mit 3 DPT-<br>Impfungen |
|------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| < 6 M.     | 2                                   | 3                                                            | 1                                         |
| 6 M.-1 J.  | 11                                  | 6                                                            | 1                                         |
| 1 J.-3 J.  | 11                                  | 4                                                            | 2                                         |
| 3 J.-5 J.  | 10                                  | 7                                                            | 1                                         |
| 5 J.-10 J. | 7                                   | 5                                                            | 1                                         |
| 10 J.      |                                     |                                                              | 8                                         |
| INSGESAMT  | 41                                  | 25                                                           | 14                                        |

Anmerkung:

In 9 Fällen wurden Titerverläufe verfolgt:

- bei 7 Pat. mit Pert.verdacht
- bei 2 Pat. mit unklarem Infekt der oberen Luftwege

Alle Serumproben wurden sowohl auf IgG- als auch auf IgM- und IgA-Antikörper (AK) hin durchgetestet; bei positiver Klinik, d. h. einem einer Pertussisinfektion entsprechendem Krankheitsverlauf, und negativer Seologie aller 3 Antikörperklassen wurden die Seren zur Abklärung der möglichen Krankheitsätiologie im Max-von-Pettenkoferinstitut in München auf Influenza-, Parainfluenza-, Respiratory-Syncytial- und Adenoviren untersucht.

## 2. Methodik

### a) Materialien

1. - Enzymkonjugate AP der Fa. Behring, hergestellt durch Kopplung von alkalischer Phosphatase (AP) mit hochaktiven Antihumanglobulin IgG oder IgM
- Enzymkonjugate der Fa. Miles-Yeda LTD, hergestellt durch Kopplung von alkalischer Phosphatase (AP) mit hochaktiven Antihumanglobulin IgA ( $\alpha$ -Kette)
2. - Zusatzreagenzien für Enzygnost (AP) der Fa. Behring
- Substrattabletten aus p-Nitrophenylphosphat
- Substratpuffer pH 6,8 enthält 100 ml Diäthanolamin und Magnesiumchlorid
- Verdünnungspuffer aus sterilem Phos-

- phatpuffer pH 7,0 (+ - 0,2) mit Tween-20-Natriumazid und Proteinzusatz
- Waschlösung (Konzentrat) aus sterilem, 20fach konzentriertem Phosphatpuffer versetzt mit Tween 20
  - 3. - Pertussisextraktantigen (Ag) der Fa. Behring (für die freundliche Überlassung dieser Reagenz danken wir der Fa. Behring)
  - 4. - Tussoglobulin der Fa. Behring (=Pertussisimmunglobulin)
  - 5. - Mikrotiterplatten aus Polystyrol

Sämtliche Reagenzien, sowie die bei -20 °C zur Lagerung tiefgefrorenen Seren müssen vor Verwendung im ELISA-Test auf Raumtemperatur (ca. 20 °C) gebracht werden.

#### b) Versuchsanordnung

##### 1. Kodierung der Mikrotiterplatten

Das Pertussisextraktantigen wird mit Phosphatpuffer pH 7,4 im Verhältnis 1 : 400 verdünnt. In jede Vertiefung der mit Polystyrol beschichteten Mikrotiterplatten gibt man 150 µl der Antigenverdünnung und inkubiert 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Dabei verbindet sich das Antigenextrakt mit der Polystyrolschicht und bildet einen unlöslichen Komplex. Nach Ablauf der 24stündigen Inkubationszeit wird mit 96 %igem, unvergälltem Alkohol 10 Minuten fi-

xiert, indem man in jede Vertiefung 200  $\mu$ l Alkohol pipettiert. Nach Ausklopfen auf Fließpapier hat man gebrauchsfertige Mikrotiterplatten, die entweder sofort verwendet oder tiefgefroren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mehrere Wochen gelagert werden können.

Unmittelbar vor Gebrauch müssen die Mikrotiterplatten mit Waschlösung pH 7,0, welche im Verhältnis 1 : 20 mit Aqua dest. verdünnt wurde, gewaschen werden.

## 2. Durchführung des ELISA-Tests

Die tiefgefrorenen Serumproben werden auf Raumtemperatur gebracht und mit Verdünnungspuffer im Verhältnis 1 : 50 zum Nachweis von IgG-Antikörpern oder im Verhältnis 1 : 200 zum Nachweis von IgM- und IgA-Antikörpern verdünnt. Mit einer Eppendorf-Pipette werden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten 200  $\mu$ l Serumverdünnung gegeben. Anschließend werden die Platten im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  zwei Stunden lang inkubiert. Die Mikrotiterplatten werden mit Tesastreifen luftdicht abgeklebt, um eine Verdunstung zu vermeiden. Sind im Serum spezifische, gegen den Polystyrol-Ag-Extraktkomplex gerichtete Antikörper vorhanden, werden sie sich während der Inkubationszeit an diesen binden. Jetzt wäscht man die Platten 8mal mit der Waschlösung. Dann gibt man in jede Vertiefung 100  $\mu$ l Konjugat IgG bzw. IgM oder IgA, das im Verhältnis 1 : 60

mit dem Verdünnungspuffer verdünnt wurde. Die Mikrotiterplatten werden wieder luftdicht abgeklebt und für 1 Stunde zum Nachweis von IgG-AK oder für 3 Stunden zum Nachweis von IgM- oder IgA-AK in den Brutschrank gegeben. Während dieser Zeit verbindet sich das mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Anti-IgG- (bzw. IgM- oder IgA-) Humanglobulin mit dem Ag-AK-Polystyrolkomplex. Danach wird wieder 8mal gewaschen und anschließend in jede Vertiefung 100  $\mu$ l Substratlösung gegeben. 45 Minuten vor Gebrauch der Substratlösung wird pro 5 ml Substratpuffer 1 Substrat-Tablette unter Lichtabschluß aufgelöst. Während der 30minütigen Inkubation, die ebenfalls unter Lichtabschluß erfolgt, verbindet sich der Enzymanteil des gebundenen Konjugats mit dem Substrat zu einem gelben Komplex. Die Reaktion wird durch Hinzufügen von 50  $\mu$ l 2 n NaOH-Lösung gestoppt. Mit dem Organon-Photometer wird der Extinktionswert des entstandenen Farbkomplexes bei 405 nm gemessen.

Jeder der insgesamt 8 Streifen einer Mikrotiterplatte enthält 12 Vertiefungen, in welche die Proben nach folgendem Schema einpipettiert werden:

1. Vertiefung: Negativkontrolle
2. Vertiefung: Positivkontrolle
3. Vertiefung: Pufferlösung
4. - 11. Vertiefung: Serumproben
12. Vertiefung: Tussoglobulin in der Verdünnung 1 : 51 200

Das empirisch ermittelte negative Kontrollserum wurde für alle Versuche beibehalten. Es wurde sichergestellt, daß das Serum von einem Patienten stammt, in dessen Anamnese weder eine akute Pertussisinfection, eine DPT-Impfung, noch ein vor kurzer Zeit durchgemachter unklarer Infekt der oberen Luftwege zu eruieren war.

Als positive Kontrolle diente Tusso globulin, das im Verhältnis 1 : 50 bei IgG und im Verhältnis 1 : 200 bei IgM und IgA mit Verdünnungspuffer versetzt worden war.

Um die Meßgenauigkeit zu überprüfen, wurden in jedem Streifen eine Pufferlösung und eine Tusso globulinverdünnung mit dem Grenztiter 1 : 51 200 als Kontrollen mitgeführt.

Die Extinktionswerte, die zur Antikörperkonzentration im Serum proportional sind, erlauben eine quantitative Bestimmung der Antikörperhöhe.

Als positives Ergebnis wurden jene Extinktionen gewertet, deren Wert den Mittelwert der negativen Kontrollen um mehr als 0,2 bei IgG und IgA und um mehr als 0,4 bei IgM überstieg.

Um die Höhe der ermittelten Antikörpertiter der einzelnen Immunglobulinklassen besser untereinander vergleichen zu können, wurde für jedes Testserum der

Faktor  $\frac{S-N}{0,2}$  für IgG- oder IgA-AK bzw. der

Faktor  $\frac{S-N}{0,4}$  für IgM-AK

ermittelt.

S = Extinktion der positiven Serumprobe

N = Mittelwert der negativen Kontrollseren

0,2 bzw. 0,4 = Grenzwert zwischen positivem und negativem Ergebnis

Als positiv wurden jene Seren bewertet, für die ein Index  $>1,0$  errechnet wurde.

#### D. Ergebnisse

##### 1. Patienten mit klinischem Verdacht einer Pertussisinfektion

Um die klinische Verdachtsdiagnose Pertussis sichern zu können, wurden die Seren von 41 Patienten mit Pertussisverdacht auf IgG-, IgM- und IgA-Antikörper untersucht.

Mit Hilfe des ELISA-Tests konnte die klinische Verdachtsdiagnose Pertussis bei Berücksichtigung von IgM- oder IgA-Antikörpern im Serum in 83 % gesichert werden. Wären die Seren nur auf das Vorhandensein von IgM-Antikörpern durchgetestet worden, hätte sich die Verdachtsdiagnose in 73 % und bei alleiniger Testung auf IgA-Antikörper in 68 % bestätigt (Tabelle 2 und 3).

Tabelle 2: Beurteilung der spezifischen IgG-, IgM- und IgA-Antikörper bei Patienten mit klinischem Verdacht einer Pertussiserkrankung

| Alter    Anzahl der Patienten |    | IgG positiv  | IgM positiv  | IgA positiv  | IgM od. IgA posit. |
|-------------------------------|----|--------------|--------------|--------------|--------------------|
| < 6 M.                        | 2  | 2            | 1            | 0            | 1                  |
| 6 M.-1 J.                     | 11 | 7            | 4            | 7            | 8                  |
| 1 J.-3 J.                     | 11 | 8            | 9            | 7            | 9                  |
| 3 J.-5 J.                     | 10 | 6            | 9            | 8            | 9                  |
| 5 J.-10 J.                    | 7  | 6            | 7            | 6            | 7                  |
| insgesamt                     | 41 | 29<br>(71 %) | 30<br>(73 %) | 28<br>(68 %) | 34<br>(83 %)       |

Tabelle 3: Aufschlüsselung der Patienten mit klinischem Verdacht einer Pertussisinfection nach Alter und positivem bzw. negativem IgM- oder IgA-Nachweis

| Alter      | Anzahl der Patienten | IgM oder IgA positiv | IgM oder IgA negativ |
|------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| < 6 M.     | 2                    | 1                    | 1                    |
| 6 M.-1 J.  | 11                   | 8                    | 3                    |
| 1 J.-3 J.  | 11                   | 9                    | 2                    |
| 3 J.-5 J.  | 10                   | 9                    | 1                    |
| 5 J.-10 J. | 7                    | 7                    | 0                    |
| INSGESAMT  | 41                   | 34<br>(83 %)         | 7<br>(17 %)          |

Um die Höhe der positiven Antikörperantwort bei Patienten mit klinischem Verdacht einer Pertussisinfection besser beurteilen zu können, wurden die Mittelwerte des Faktors  $\frac{S-N}{0,2}$  für IgA- bzw.  $\frac{S-N}{0,4}$  für IgM-AK errechnet. Der Durchschnitt der positiven Faktorwerte der einzelnen Altersgruppen liegt zwischen 2,4 und 3,5 und beträgt im Mittel 2,9 bezogen auf die IgM-AK; bei IgA-AK bewegt sich der Wert zwischen 1,5 und 1,9, so daß sich ein Mittel von 1,8 ergibt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Beurteilung der positiven AK-antwort mit Hilfe des Faktors  $\frac{S-N}{0,4}$  für IgM- bzw.  $\frac{S-N}{0,2}$  für IgA-AK bei Patienten mit klinischem Verdacht einer Pertussisinfection

| Alter      | Anzahl d. IgM oder IgA posit. Pat. | Anzahl d. IgM posit. Pat. | Mittelwert des Fakt. $\frac{S-N}{0,4}$ bei IgM posit. Pat. | Anzahl d. IgA posit. Pat. | Mittelwert d. Fakt. $\frac{S-N}{0,2}$ bei IgA posit. Pat. |
|------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------|
| < 6 M.     | 1                                  | 1                         | 2,4                                                        | 0                         | -                                                         |
| 6 M.-1 J.  | 8                                  | 4                         | 2,5                                                        | 7                         | 1,5                                                       |
| 1 J.-3 J.  | 9                                  | 9                         | 3,5                                                        | 7                         | 1,7                                                       |
| 3 J.-5 J.  | 9                                  | 9                         | 3,0                                                        | 8                         | 1,9                                                       |
| 5 J.-10 J. | 7                                  | 7                         | 3,3                                                        | 6                         | 1,9                                                       |
| INSGESAMT  | 34                                 | 30                        | 2,9                                                        | 28                        | 1,8                                                       |

Zur Abklärung der möglichen Krankheitsätiologie wurden die Seren von Patienten mit einem pertussisähnlichen Krankheitsbild und negativer Serologie aller 3 Antikörperklassen im Max-von-Pettenkoferinstitut auf Respiratory-Syncytial-, Adeno-, Parainfluenza- und Influenzaviren getestet.

Von den insgesamt 7 Patienten mit klinischem Verdacht einer Pertussisinfektion und Fehlen von IgM-, IgA-, bzw. IgG-Antikörpern im Serum konnte bei 3 Patienten ein anderer Krankheitserreger und zwar bei 2 Patienten Adenoviren, bei einem Patienten das Respiratory-Syncytial-Virus nachgewiesen werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Patienten mit klinischem Verdacht einer Pertussisinfektion und negat. IgM-, IgA- bzw. IgG-Pertussisantikörper, aufgeschlüsselt nach Respirationsviren

| Patient | Alter     | ANTIKÖRPER GEGEN |       |               |           |
|---------|-----------|------------------|-------|---------------|-----------|
|         |           | RSV              | Adeno | Parainfluenza | Influenza |
| 1       | 4 M.      | neg.             | neg.  | neg.          | neg.      |
| 2       | 7 M.      | neg.             | neg.  | neg.          | neg.      |
| 3       | 10,5 M.   | pos.             | neg.  | neg.          | neg.      |
| 4       | 1 J. 3 M. | neg.             | neg.  | neg.          | neg.      |
| 5       | 2 J. 2 M. | neg.             | pos.  | neg.          | neg.      |
| 6       | 3 J. 1 M. | neg.             | neg.  | neg.          | neg.      |
| 7       | 4 J. 6 M. | neg.             | pos.  | neg.          | neg.      |

## 2. Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege

Um abortive oder atypische Pertussisinfectionen zu erfassen, wurden die Seren von 25 Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege auf IgG-, IgM- und IgA-Antikörper untersucht.

Mit Hilfe des ELISA-Tests konnte bei Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege bei Berücksichtigung von IgM- oder IgA-Antikörpern im Serum die Diagnose Pertussis in 32 % gestellt werden. Wären die Seren nur auf das Vorhandensein von IgM-Antikörpern untersucht worden, hätte sich in 28 % und bei alleiniger Testung auf IgA-Antikörper in 20 % die Diagnose Pertussis stellen lassen (Tabelle 6 und 7).

Tabelle 6: Beurteilung der spezifischen IgG-, IgM- und IgA-Antikörper bei Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege

| Alter      | Anzahl d. Pat. | IgG pos.     | IgM pos.    | IgA pos.    | IgM- od. IgA pos. |
|------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------------|
| < 6 M.     | 3              | 2            | 0           | 1           | 1                 |
| 6 M.-1 J.  | 6              | 2            | 2           | 1           | 2                 |
| 1 J.-3 J.  | 4              | 3            | 2           | 0           | 2                 |
| 3 J.-5 J.  | 7              | 3            | 2           | 2           | 2                 |
| 5 J.-10 J. | 5              | 4            | 1           | 1           | 1                 |
| INSGESAMT  | 25             | 14<br>(56 %) | 7<br>(28 %) | 5<br>(20 %) | 8<br>(32 %)       |

Tabelle 7: Aufschlüsselung der Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege nach Alter und positivem bzw. negativem IgM- oder IgA-Nachweis

| Alter      | Anzahl der Patienten | IgM od. IgA positiv | IgM od. IgA negativ |
|------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| < 6 M.     | 3                    | 1                   | 2                   |
| 6 M.-1 J.  | 6                    | 2                   | 4                   |
| 1 J.-3 J.  | 4                    | 2                   | 2                   |
| 3 J.-5 J.  | 7                    | 2                   | 5                   |
| 5 J.-10 J. | 5                    | 1                   | 4                   |
| INSGESAMT  | 25                   | 8<br>(32 %)         | 17<br>(68 %)        |

Um die Höhe der positiven Antikörperantwort bei Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege besser beurteilen zu können, wurden die Mittelwerte des Faktors  $\frac{S-N}{0,2}$  für IgA- bzw.  $\frac{S-N}{0,4}$  für die IgM-AK errechnet. Der Durchschnitt der positiven Faktorwerte der einzelnen Altersgruppen liegt zwischen 2,5 und 3,1 und beträgt im Mittel 2,8 bezogen auf die IgM-AK; bei IgA-AK bewegt sich der Wert zwischen 1,4 und 2,0, so daß sich ein Mittel von 1,7 ergibt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Beurteilung der positiven Antikörperantwort mit Hilfe des Faktors  $\frac{S-N}{0,2}$  für IgA- bzw.  $\frac{S-N}{0,4}$  für IgM-AK bei Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege

| Alter      | Anzahl d. IgM oder IgA posit. Pat. | Anzahl d. IgM pos. Pat. | Mittelwert d. Fakt. $\frac{S-N}{0,4}$ bei IgM pos. Pat. | Anzahl d. IgA pos. Pat. | Mittelwert d. Fakt. $\frac{S-N}{0,2}$ bei IgA pos. Pat. |
|------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------|
| < 6 M.     | 1                                  | 0                       | -                                                       | 1                       | 1,6                                                     |
| 6 M.-1 J.  | 2                                  | 2                       | 2,5                                                     | 1                       | 1,8                                                     |
| 1 J.-3 J.  | 2                                  | 2                       | 2,9                                                     | 0                       | -                                                       |
| 3 J.-5 J.  | 2                                  | 2                       | 3,1                                                     | 2                       | 1,4                                                     |
| 5 J.-10 J. | 1                                  | 1                       | 2,5                                                     | 1                       | 2,0                                                     |
| INSGESAMT  | 8                                  | 7                       | 2,8                                                     | 5                       | 1,7                                                     |

### 3. Patienten mit 3 DPT-Impfungen im 1. Lebensjahr

Um den Impferfolg bzw. die Immunitätslage nach 3 DPT-Impfungen beurteilen zu können, wurden die Seren von 14 geimpften Patienten auf IgG-, IgM- und IgA-Antikörper untersucht.

Mit Hilfe des ELISA-Tests konnten in 86 % der Fälle IgG-Antikörper, aber nur in 14 % der Fälle IgM- oder IgA-Antikörper nachgewiesen werden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Beurteilung der spezifischen IgG- bzw. IgM- oder IgA-Antikörper bei Patienten mit gesicherter Impfanamnese d. h. 3 DPT-Impfungen im ersten Lebensjahr

| Alter      | Anzahl der<br>geimpften<br>Pat. | Anzahl der<br>IgG pos. Pat | Anzahl der IgM<br>oder IgA pos.<br>Pat. |
|------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------|
| <6 M.      | 1                               | 0                          | 0                                       |
| 6 M.-1 J.  | 1                               | 1                          | 0                                       |
| 1 J.-3 J.  | 2                               | 1                          | 1                                       |
| 3 J.-5 J.  | 1                               | 1                          | 1                                       |
| 5 J.-10 J. | 1                               | 1                          | 0                                       |
| > 10 J.    | 8                               | 8                          | 0                                       |
| INSGESAMT  | 14                              | 12<br>(86 %)               | 2<br>(14 %)                             |

Um die Höhe der positiven Antikörperantwort bei Patienten mit 3 DPT-Impfungen im ersten Lebensjahr besser beurteilen zu können, wurden die Mittelwerte des Faktors  $\frac{S-N}{0,2}$  für IgG- und IgA-AK bzw.  $\frac{S-N}{0,4}$  für IgM-AK errechnet. Der Durchschnitt der positiven Faktorwerte der einzelnen Altersgruppen liegt zwischen 2,3 und 2,9 und beträgt im Mittel 2,6 bezogen auf die IgG-AK; bei IgM-AK bewegt sich der Wert zwischen 2,3 und 2,9, so daß sich ein Mittel von 2,6 ergibt. Bei den IgA-AK bewegt sich der Wert zwischen 1,3 und 1,7 und beträgt im Mittel 1,5 (Tabelle 10).

Tabelle 10: Beurteilung der positiven Antikörperantwort mit Hilfe des Faktors  $\frac{S-N}{0,2}$  für IgG- und IgA-AK bzw.  $\frac{S-N}{0,4}$  für IgM-AK bei Patienten mit gesicherter Impfanamnese

| Alter      | Anzahl d. IgG pos. Pat. | Mittelwert d. Fkt. $\frac{S-N}{0,2}$ bei IgG pos. Pat. | Anzahl d. IgM pos. Pat. | Mittelwert d. Fkt. $\frac{S-N}{0,4}$ bei IgM pos. Pat. | Anzahl d. IgA pos. Pat. | Mittelwert d. Fkt. $\frac{S-N}{0,2}$ bei IgA pos. Pat. |
|------------|-------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------|
| < 6 M.     | 0                       | -                                                      | 0                       | -                                                      | 0                       | -                                                      |
| 6 M.-1 J.  | 1                       | 2,3                                                    | 0                       | -                                                      | 0                       | -                                                      |
| 1 J.-3 J.  | 1                       | 2,9                                                    | 1                       | 2,3                                                    | 1                       | 1,7                                                    |
| 3 J.-5 J.  | 1                       | 2,6                                                    | 1                       | 2,9                                                    | 1                       | 1,3                                                    |
| 5 J.-10 J. | 1                       | 2,8                                                    | 0                       | -                                                      | 0                       | -                                                      |
| 10 J.      | 8                       | 2,3                                                    | 0                       | -                                                      | 0                       | -                                                      |
| IN GESAMT  | 12                      | 2,6                                                    | 2                       | 2,6                                                    | 2                       | 1,5                                                    |

Tabelle 11: Höhe des IgG-Antikörperspiegels bei geimpften Kindern im Alter von 1-5 Jahren (15).

| Alter | Anzahl der Pert.-<br>impfungen | Faktor |
|-------|--------------------------------|--------|
| 3     | 4                              | 2,2    |
| 3     | ?                              | 5,9    |
| 5     | 1                              | 5,4    |
| 2     | 1                              | 1,8    |
| 1     | 1                              | 2,1    |
| 2     | 3                              | 1,3    |
| 3     | 3                              | 1,4    |

$$Fkt_{(1)} = 2,9$$

#### 4. Patienten mit positivem ELISA-Testergebnis

Patienten mit positivem IgM- bzw. IgA-Antikörperrnachweis im ELISA-Test wurden unter Berücksichtigung ihrer klinischen Diagnosen aufgelistet, um aufzuzeigen, inwieweit der ELISA-Test den klinischen Verdacht einer Pertussisinfection bestätigen kann und in welchem Maße er bei Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege die Diagnose Pertussis ermöglichen kann.

Insgesamt konnten bei 42 Patienten mit dem ELISA-Test IgM- oder IgA-Antikörper nachgewiesen werden. Bei 34 Patienten bestand klinisch der Verdacht einer Pertussisinfection. 8 Patienten waren wegen eines unklaren Infektes der oberen Luftwege eingeliefert worden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Aufschlüsselung der IgM oder IgA positiven Patienten mit akuten Infektionen nach Alter und Diagnosen

| Alter      | Anzahl der IgM oder IgA pos. Pat. | Pat. mit Pertussis-verdacht | Pat. mit unklarem Infekt d. oberen Luftwege |
|------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|
| 6 M.       | 2                                 | 1                           | 1                                           |
| 6 M.-1 J.  | 10                                | 8                           | 2                                           |
| 1 J.-3 J.  | 11                                | 9                           | 2                                           |
| 3 J.-5 J.  | 11                                | 9                           | 2                                           |
| 5 J.-10 J. | 8                                 | 7                           | 1                                           |
| INSGESAMT  | 42                                | 34                          | 8                                           |

Um feststellen zu können, inwieweit positive ELISA-Testergebnisse mit den als spezifisch für eine Pertussisinfection angesehenen Blutbildveränderungen wie Leukozytose  $> 15\,000 / \text{mm}^3$  mit gleichzeitiger Lymphozytose  $> 70\%$  korrelieren, wurden Patienten mit positivem IgM- oder IgA-Nachweis auf das Vorhandensein oben aufgeführter Laborparameter hin aufgelistet.

Von den insgesamt 42 Patienten mit positivem IgM- oder IgA-Nachweis hatten 32 Patienten eine Leukozytose  $> 15\,000 / \text{mm}^3$  mit gleichzeitiger Lymphozytenvermehrung auf über 70 %. Das bedeutet eine Übereinstimmung des ELISA-Testergebnisses mit dem für Pertussis typischen Differentialblutbild bei 76 % der untersuchten Patienten (Tabelle 13).

Tabelle 13: Häufigkeit von Leukozytose  $> 15\,000 / \text{mm}^3$   
mit gleichzeitiger Lymphozytose  $> 70\%$   
bei IgM oder IgA positiven Patienten  
mit akuten Infektionen

| Alter      | Anzahl der<br>IgM od. IgA<br>pos. Pat. | Leukozytose m.<br>Lymphozytose | keine Leukozy-<br>tose mit Lympho-<br>zytose |
|------------|----------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|
| 6 M.       | 2                                      | 2                              | 0                                            |
| 6 M.-1 J.  | 10                                     | 10                             | 0                                            |
| 1 J.-3 J.  | 11                                     | 8                              | 3                                            |
| 3 J.-5 J.  | 11                                     | 7                              | 4                                            |
| 5 J.-10 J. | 8                                      | 5                              | 3                                            |
| INSGESAMT  | 42                                     | 32<br>(76 %)                   | 10<br>(24 %)                                 |

5. Patienten, bei denen Titerverläufe beobachtet wurden

Um die sich ändernde Antikörperproduktion im Laufe einer Erkrankung zu erfassen, wurden bei Patienten mit Pertussisverdacht und unklarem Infekt der oberen Luftwege mit Hilfe des ELISA-Tests IgA- und IgM-Bestimmungen in zeitlichem Abstand durchgeführt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Auflistung der 9 Patienten, bei denen  
Titerverläufe beobachtet werden konnten  
nach Alter und Diagnosen

| Alter      | Pertussisverdacht | unklarer Infekt der oberen Luftwege |
|------------|-------------------|-------------------------------------|
| < 6 M.     | 1                 | 1                                   |
| 6 M.-1 J.  | 1                 | 1                                   |
| 1 J.-3 J.  | 3                 | 0                                   |
| 3 J.-5 J.  | 2                 | 0                                   |
| 5 J.-10 J. | 0                 | 0                                   |
| INSGESAMT  | 7                 | 2                                   |

Wie man aus der Verlaufsbewertung ersehen kann, genügt eine Serumprobe, um mit Hilfe des IgM- bzw. IgA-ELISA-Tests die Diagnose Pertussis zu stellen. Gepaarte d. h. in zeitlichem Abstand gewonnene Seren bringen gegenüber der Einzelbestimmung keine weiteren Vorteile, da sie nur das Ergebnis der Antikörperbestimmung der ersten Serumprobe bestätigen (Tabelle 15 und 16).

Tabelle 15: Beurteilung der Antikörperantwort mit Hilfe des Faktors  $\frac{S-N}{0,2}$  für IgG- und IgA-AK bzw.  $\frac{S-N}{0,4}$  für IgM-AK bei Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege, bei denen Verlaufskontrollen durchgeführt wurden.

Die Abnahme der ersten Serumprobe erfolgte bei Auftreten der Hustenanfälle.

Positive Faktorwerte d. h. Indexwerte  $> 1,0$  wurden zur Hervorhebung eingerahmt.

| Alter | Zeitlicher Abstand<br>der Serumproben | Fkt. $\frac{S-N}{0,4}$<br>f. IgM-AK | Fkt. $\frac{S-N}{0,2}$<br>f. IgA-AK | Fkt. $\frac{S-N}{0,2}$<br>f. IgG-AK |
|-------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 3 Wo. | 1. Serumprobe                         | 0,8                                 | 0,8                                 | 1,8                                 |
|       | 17. Tag                               | 0,9                                 | 1,0                                 | 1,9                                 |
| 8 Mo. | 1. Serumprobe                         | 0,8                                 | 0,9                                 | 0,9                                 |
|       | 11. Tag                               | 0,8                                 | 0,8                                 | 0,9                                 |

Tabelle 16: Beurteilung der Antikörperantwort mit Hilfe des Faktors  $\frac{S-N}{0,2}$  für IgG- und IgA-AK bzw.  $\frac{S-N}{0,4}$  für IgM-AK bei Patienten mit Pertussisverdacht, bei denen Verlaufskontrollen durchgeführt wurden.

Die Abnahme der ersten Serumprobe erfolgte bei Auftreten der Hustenanfälle.

Positive Faktorwerte d. h. Indexwerte  $> 1,0$  wurden zur Hervorhebung eingerahmt.

| Alter    | Zeitlicher Abstand der Serumproben | Fkt. $\frac{S-N}{0,4}$<br>f. IgM-AK | Fkt. $\frac{S-N}{0,2}$<br>f. IgA-AK | Fkt. $\frac{S-N}{0,2}$<br>f. IgG-AK |
|----------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 5 M.     | 1. Serumprobe                      | 0,8                                 | 0,9                                 | 0,8                                 |
|          | 29. Tag                            | 0,7                                 | 0,8                                 | 0,6                                 |
|          | 186. Tag                           | 0,8                                 | 0,9                                 | 0,8                                 |
| 8 M.     | 1. Serumprobe                      | 2,5                                 | 0,9                                 | 1,0                                 |
|          | 32. Tag                            | 2,3                                 | 1,8                                 | 0,9                                 |
|          | 43. Tag                            | 2,7                                 | 1,8                                 | 1,0                                 |
| 1J. 5M.  | 1. Serumprobe                      | 3,1                                 | 1,8                                 | 1,0                                 |
|          | 30. Tag                            | 2,3                                 | 0,8                                 | 1,0                                 |
| 1J. 6M.  | 1. Serumprobe                      | 4,0                                 | 2,0                                 | 0,8                                 |
|          | 11. Tag                            | 4,3                                 | 2,0                                 | 1,0                                 |
| 2J. 9M.  | 1. Serumprobe                      | 2,9                                 | 2,0                                 | 1,0                                 |
|          | 42. Tag                            | 2,2                                 | 2,0                                 | 0,9                                 |
| 3J. 8M.  | 1. Serumprobe                      | 3,1                                 | 1,7                                 | 0,8                                 |
|          | 88. Tag                            | 2,4                                 | 1,8                                 | 1,9                                 |
|          | 186. Tag                           | 0,8                                 | 1,8                                 | 2,0                                 |
| 4J. 10M. | 1. Serumprobe                      | 1,0                                 | 0,8                                 | 0,9                                 |
|          | 117. Tag                           | 0,9                                 | 0,9                                 | 1,2                                 |

## E. Diskussion

Eine in Indien im Jahre 1979 durchgeführte Studie zeigt, daß bei ca. 48 % der Normalbevölkerung mit dem Agglutinationstest Antikörper gegen Bordetella pertussis nachgewiesen werden können. Berücksichtigt man nur die Altersgruppe der 5-14-jährigen steigt dieser Wert sogar auf 53 % an (28).

Die nachgewiesenen Antikörper gehören größtenteils der IgG-Klasse an, wie Mertsola u. Mitarbeiter mit Hilfe des ELISA-Tests zeigen konnten, da sie bei Patienten ohne Pertussissymptomatik nur niedrige IgM- und IgA-Titer, jedoch hohe IgG-Titer feststellten (9, 21). Wir haben bei 71 % der Patienten mit klinischem Verdacht einer Pertussiserkrankung und bei 56 % der Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege Antikörper der IgG-Klasse gefunden. Beide Patientengruppen weisen IgG-Antikörper auf; die prozentuale Verteilung unterscheidet sich nicht signifikant genug, um eine Neuinfektion anhand dieses Parameters diagnostizieren zu können, da diese Antikörperklasse nach durchgemachter Infektion persistiert und somit nur eine Aussage über den Durchseuchungsgrad in der Bevölkerung erlaubt (Tabelle 2 und 6).

Zur Beurteilung einer akuten Infektion haben wir deshalb nur eindeutig positive IgM- bzw. IgA-Titer berücksichtigt.

Bei Patienten mit klinischem Verdacht einer Pertussisinfektion konnten wir mit Hilfe des ELISA-Tests bei

Berücksichtigung von IgM- oder IgA-Antikörpern die Diagnose in 83 % der Fälle bestätigen. Hätten wir die Patientenseren nur auf IgM-Antikörper hin getestet, wäre in 73 % und bei Testung auf IgA-Antikörper in 68 % der Nachweis einer Keuchhusteninfektion gelungen (Tabelle 2).

Mit Hilfe des ELISA-Tests konnten wir bei Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege bei 28 % IgM-Antikörper und bei 20 % IgA-Antikörper nachweisen. Kombiniert man diese beiden Antikörpertests, so läßt sich auch hier der Prozentsatz an positiven Ergebnissen steigern und zwar auf 32 % (Tabelle 6).

Um herauszufinden, ob der ELISA-Test bei den 7 Patienten mit klinischer Pertussissymptomatik und negativen IgM- bzw. IgA-Antikörpern im Serum versagt hat, oder ob es sich um ein sogenanntes Pertussissyndrom, hervorgerufen durch andere Erreger, handelt, haben wir im Max-von-Pettenkofer-Institut in München diese 7 Patientenseren auf Adeno-, Respiratory-Syncytial-, Influenza- und Parainfluenzaviren untersuchen lassen. Obwohl wir in den meisten Fällen nur eine Serumprobe zur Verfügung hatten und für die Komplementbindungsreaktion (KBR) Titeranstiege innerhalb von 4 Wochen beweisend wären, konnten wir nach Berücksichtigung des Abnahmedatums bei Vorliegen niedriger KBR-Werte mit ziemlicher Sicherheit davon ausgehen, daß keine Infektion mit oben aufgeführten Respirationsviren vorliegt, wenn seit Erkrankungsbeginn mehr als eine Woche verstrichen ist. Treten dagegen bereits während der ersten Woche nach Infektionsbeginn hohe KBR-Werte auf, kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit eine

Infektion mit oben aufgeführten Respirationsviren annehmen. Nach Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte konnten wir in 3 Fällen einen anderen Krankheitserreger nachweisen. Bei 2 Patienten waren es Adenoviren, bei einem Patienten das Respiratory-Syncytial-Virus, die zu einem pertussisähnlichen Krankheitsbild geführt hatten (Tabelle 5).

Nimmt man diese 3 Patienten aus dem Gesamtkrankengut von 41 pertussisverdächtigen Fällen heraus, so errechnet sich für die Zuverlässigkeit, mit der der ELISA-Test IgM- oder IgA-Antikörper während der akuten Phase einer Pertussisinfection nachweist, ein Prozentsatz von 89 %.

Von den insgesamt 42 Patienten mit IgM- oder IgA-Antikörpern im Serum hatten 32 Patienten eine Leukozytose  $> 15\,000 / \text{mm}^3$  mit einem Anteil an Lymphozyten  $> 70\%$ . Auch hier korreliert das Ergebnis im ELISA-Test gut mit dem für eine Pertussisinfection typischen Differentialblutbild. Eine Übereinstimmung ergab sich bei 76 % der untersuchten Patienten (Tabelle 13).

Bei den 9 Patienten, bei denen wir Titerverläufe beobachtet haben, konnten wir zeigen, daß IgM- und IgA-Antikörper bereits in der ersten Serumprobe, die zu Beginn der Hustenanfälle abgenommen wurde, nachweisbar sind, wobei die IgM-Antikörper anfangs in einer höheren Konzentration im Serum vorliegen und dann absinken, während die IgA-Antikörperkonzentration von Anfang an niedriger ist. Die IgG-Antikörper treten erst spät und zwar mit einer Latenz von ca.  $1/4$  Jahr nach den ersten Hustenattacken auf. Das Vorhandensein von IgG-Antikörpern bereits zu

Beginn der Hustenanfälle bei dem 3 Wochen alten Säugling erklärt sich aus der Tatsache, daß diese Antikörper vom Säugling nicht selbst gebildet worden sind, sondern von der Mutter auf ihn übertragen wurden. Beweisend für eine akute Infektion wären IgM-Antikörper, da diese wegen ihres hohen Molekulargewichts nicht auf diaplazentarem Wege übertragbar sind (9, 16, Tabelle 15 und 16).

Von den 14 Patienten, die 3 DPT-Impfungen erhielten, weisen 86 % IgG-Antikörper, aber nur 14 % IgA- oder IgM-Antikörper auf. Dieses Ergebnis zeigt, daß die spät auftretenden IgG-Antikörper persistieren, während die bereits in der akuten Phase gebildeten IgM- und IgA-Antikörper wieder absinken. Impferfolg und Immunitätslage lassen sich deshalb gut mit Hilfe des IgG-ELISA-Tests überprüfen (Tabelle 9).

Eine im Jahre 1979 von Macaulay durchgeführte Studie zeigt, daß die IgM-Antikörperantwort nach akuten Infektionen höher als nach Impfungen ausfällt (18). Wir konnten dies auch im Hinblick auf die Höhe der IgA-Antwort bestätigen. Ein Vergleich der Antikörperhöhe bei akuten Infektionen und nach DPT-Impfung mit Hilfe des Faktors  $\frac{S-N}{0,2}$  für IgA- und IgG-AK bzw.  $\frac{S-N}{0,4}$  für IgM-AK zeigt, daß sowohl die IgM- als auch die IgA-Antikörper während einer akuten Infektion im Mittel in höherer Konzentration vorliegen, als dies nach 3 DPT-Impfungen der Fall ist. Der Mittelwert des Faktors  $\frac{S-N}{0,4}$  für IgM-Antikörper liegt abgesehen von einigen sehr hohen Werten bei akuten Infektionen, bei denen klinisch der Verdacht auf eine Pertussisinfektion bestand, bei 2,9 bzw. 2,8 bei Patienten mit unklarem In-

fekt der oberen Luftwege, nach DPT-Impfung um 2,6. Auch die IgA-Antikörper sind bei akuten Pertussisinfektionen höher konzentriert, der Faktor liegt bei 1,8 bzw. 1,7, im Unterschied zu 1,5 nach DPT-Impfung (Tabelle 4, 8, 10). Der Mittelwert des Faktors  $\frac{S-N}{0,2}$  für die IgG-Antikörper liegt nach 3 DPT-Impfungen zwischen 2,6 und 2,9 (Tabelle 10, 11).

Der ELISA-Test stellt eine wertvolle Ergänzung der Möglichkeiten einer gezielten Pertussisdiagnostik dar, da er spezifisch Antikörper gegen *Bordetella pertussis* bzw. *parapertussis* nachweist.

Bereits bei Auftreten der ersten Hustenanfälle können im Serum IgM- oder IgA-Antikörper in hoher Konzentration gefunden werden, da die Empfindlichkeit des ELISA-Tests sehr hoch ist. In 89 % der Fälle konnte die Verdachtsdiagnose Pertussis mit einer einzigen Serumprobe bei Berücksichtigung beider Antikörperklassen bestätigt werden.

Der ELISA-Test ist ein einfach durchzuführendes Verfahren, das mit geringen Serummengen auskommt.

Da mit dem ELISA-Test quantitative Aussagen über den Antikörpergehalt möglich sind, eignet er sich sehr gut zur Verlaufskontrolle einer Pertussisinfektion.

Abortive oder atypische Pertussiserkrankungen, die oft unter dem Sammelbegriff "unklarer Infekt der oberen Luftwege" laufen, können von den Pertussissyndromen anderer Ätiologie abgegrenzt werden. Auch hier

genügt der Nachweis von IgM- oder IgA-Antikörpern in einer einzigen Serumprobe.

Der große Vorteil des ELISA-Tests liegt in seiner schnellen Verfügbarkeit und in dem gezielten Nachweis von IgM- und IgA-Antikörpern, was eine Abgrenzung zwischen Neuinfektion und weiter zurückliegenden Infektionen bzw. Impfungen erlaubt. Außerdem kann man den Impferfolg oder die Immunitätslage gezielt überprüfen, indem man den quantitativen Antikörpergehalt mißt.

#### F. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des ELISA-Tests die Antikörperantwort bei 80 Patienten der Universitätskinderklinik in München, die entweder klinisch das Bild einer Pertussisinfection, eines unklaren Infekts der oberen Luftwege boten, oder die 3 DPT-Impfungen erhalten hatten, untersucht.

Der ELISA-Test ist eine sehr empfindliche Methode, welche spezifisch die einzelnen Antikörperklassen nachzuweisen vermag. Neben der qualitativen Untersuchung gelingt mit diesem Untersuchungsverfahren auch die Erfassung der Antikörpertiterhöhe.

Bei Patienten mit klinischer Pertussissymptomatik konnte der IgM- kombiniert mit dem IgA-ELISA-Test die Verdachtsdiagnose in 89 % bestätigen. Bei 32 % der Patienten mit unklarem Infekt der oberen Luftwege wurde mit Hilfe des kombinierten IgM- und IgA-ELISA-Tests eine exakte Diagnose gestellt.

Eine gute Korrelation liegt zwischen den für eine Pertussisinfection als spezifisch angesehenen Laborparametern wie Leukozytose  $>15\ 000 / \text{mm}^3$  mit einem Lymphozytenanteil  $>70\ %$  und positiven ELISA-Testergebnissen vor. 76 % der Probanden mit diesen spezifischen Blutbildveränderungen wiesen positive IgM- oder IgA-Antikörper auf.

Eine vom Max-von-Pettenkofer-Institut in München bei seronegativen Patienten mit klinischer Pertussissymptomatik durchgeführte Untersuchung zeigte, daß in 3 Fällen Viren als Ursache dieses ähnlichen Krankheitsbildes eruiert werden konnten.

Im Gegensatz zu den akuten Infektionen ließen sich bei Patienten mit 3 erhaltenen DPT-Impfungen nur in 14 % IgM- oder IgA-Antikörper nachweisen, jedoch in 86 % IgG-Antikörper. Während die IgG-Antikörper persistieren und deshalb eine Aussage über den Durchseuchungsgrad in der Bevölkerung erlauben, sinken die als Marker einer akuten Infektion angesehenen IgM- und IgA-Antikörper mit der Zeit wieder ab.

Mit dem IgM- bzw. IgA-ELISA-Test ist eine gezielte Pertussisroutinediagnostik bereits bei Auftreten der ersten Hustenanfälle möglich geworden. Mit einer Sensitivität von 89 % ist diese neuartige Untersuchungsmethode den anderen serologischen Tests überlegen und erfordert dabei nur einen geringen zeitlichen und apparativen Aufwand.

G. Literaturverzeichnis

1. Aftandelians, R., Connor, J. D. Immunologic studies of pertussis: Development of precipitins. J. Pediatr. 83: 206 - 214, 1973
2. Broome, C. V., Fraser, D. W. Pertussis in the United States, 1979: A Look at Vaccine Efficacy. J. Infect. Dis. 144: 187 - 190, 1981
3. Broome, C. V., Fraser, D. W., English, W. J. Pertussis diagnostic methods and surveillance. In C. R. Manclark and J. C. Hill (eds.). International symposium on pertussis. U. S. Department of Health, Education, and Welfare, Bethesda. Md., 1978, p. 19 - 22
4. Broome, C. V., Preblud, S. R., Bruner, B., McGowan, J. E., Hayes, P. S., Harris, P. P., Elsea, W., Fraser, D. W. Epidemiology of pertussis, Atlanta, 1977. J. Pediatr. 98: 362 - 367, 1981
5. Carlson, H. E., Lindberg, A. A., Hammarström, S. Titration of antibodies to Salmonella O antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. Infect. Immun. 6: 703 - 710, 1972
6. Dieckhoff, J., Schneeweiss, B. Pathobiologie des Keuchhustens in Ocklitz, W. (ed.). Der Keuchhusten, Jena, 1969, p. 21 - 42
7. Feigin, R. D. Infections with specific organisms: Pertussis. Textbook Ped. Infect. Dis. 27: 932 - 935, 1981

8. Goodman, Y. E., Wort, A. J., Jackson, F. L. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pertussis immunoglobulin A in nasopharyngeal secretions as an indicator of recent infections. J. Clin. Microbiol. 13: 286 - 292, 1981
9. Granström, M., Lindberg, A. A., Aselöf, P., Hederstedt, B. Detection of antibodies in human serum against haemagglutinin of Bordetella pertussis by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Med. Microbiol. 15: 85 - 96, 1982
10. Hartung, K. Zur Epidemiologie der Pertussis 1976 bis 1980. Die gelben Hefte 22: 75 - 80, 1982
11. Hennessen, W. Risiken der Pertussis-Erkrankung und der Pertussis-Impfung. Die gelben Hefte 22: 128 - 129, 1982
12. Helting, T. B., Blackkolb, F. Extracted protective antigen of Bordetella pertussis. Acta path. microbiol. scand. Sect. B. 89: 93 - 101, 1981
13. Katz, S. L., Wilfert, C. M. New thoughts on pertussis. Pediatrics 63: 941 - 942, 1979
14. Keller, M. A., Aftandelians, R., Connor, J. D. Etiology of Pertussis Syndrome. J. Pediat. 66: 50 - 55, 1980
15. König, C. Antikörper gegen Bordetella pertussis bei Kindern und Erwachsenen. Nachweis von IgG-Antikörpern mit Hilfe eines neuentwickelten ELISA-Testverfahrens. Diss. im Druck: 1 - 45, 1985

16. Krugmann, S., Katz, S. L. Pertussis. J. Infect. Dis. Child: 245 - 250, 1981
17. Linnemann, C. C. Host-parasite interactions in pertussis. In C. R. Manclark and J. C. Hill (eds.). International symposium on pertussis. U. S. Department of Health, Education, and Welfare, Bethesda. Md., 1978, p. 3 - 15
18. Macaulay, M. E. The IgM and IgG Response to Bordetella pertussis vaccination and infection. Med. Microbiol. 14: 1 - 7, 1981
19. Macaulay, M. E. The serological diagnosis of whooping cough. J. Hyg. 83: 95 - 102, 1979
20. Martinez-Valverde, A., León, D. K., Jurado, A., Parra, V. Diagnosis and treatment of pertussis. Paediatr. 8: 65 - 72, 1979
21. Mertsola, J., Ruuskanen, O., Kuronen, T., Viljanen, M. K. Serologic diagnosis of pertussis: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and bacterial agglutination. J. Infect. Dis. 147: 252 - 257, 1983
22. Miles, R. N., Hosking, G. P. Pertussis: should we immunise neurologically disabled and developmentally delayed children? Brit. Med. J. 287: 318-320, 1983
23. Miller, D. L., Ross, E. M., Alderslade, R., Bellmann, M. H., Rawson, N. S. B. Pertussis immuni-

- sation and serious acute neurological illness in children: Brit. Med. J. 282: 1595 - 1599, 1981
24. Nelson, D. J. The changing epidemiology of pertussis in young infants: The role of adults as reservoir of infection. Am. J. Dis. Child. 132: 371 - 373, 1978
25. Pesce, A. J., Ford, D. J., Gaizutis, M. A. Qualitative and quantitative aspects of immunoassays. Scand. J. Med. Res. 70: 5 - 12, 1979
26. Preston, N. W. Technical problems in the laboratory diagnosis and prevention of whooping cough. Laboratory Practice 19: 482 - 486, 1970
27. Public Health Laboratory Service: Diagnosis of whooping cough: Comparison of serological tests with isolation of Bordetella pertussis. A combined Scottish study. Br. Med. J. 4: 637 - 639, 1970
28. Saran, G., Angra, S. S., Balasubrahmanyam, M. Antibody against whooping cough in normal population. Ind. J. Med. Res. 70: 5 - 12, 1979
29. Viljanen, M. K., Ruuskanen, O., Granberg, C., Salmi, T. T. Serological diagnosis of pertussis: IgM, IgA and IgG antibodies against Bordetella pertussis measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Scand. J. Infect. Dis. 14: 117 - 122, 1982

Meinem Doktorvater, Herrn Prof.

Dr. Peter Feller, danke ich für

die Überlassung des Themas und

für seine verständnisvolle

Unterstützung im Verlauf der

Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem den

medizinisch-technischen

Assistentinnen des Viruslabors

für deren vorbereitende Arbeit.



## Lebenslauf

Am 03. 05. 1959 wurde ich als ältestes Kind des Ehepaars Josef Dicklhuber, Maurerpolier, und seiner Ehefrau Gisela Dicklhuber, geb. Mechsner, in Passau geboren.

Von 1965 - 1971 besuchte ich die Volksschule Heining. 1971 wechselte ich auf die Gisela-Realschule der Englischen Fräulein Passau-Niedernburg und erhielt 1975 das Zeugnis der Mittleren Reife.

Im Sommer 1975 bewarb ich mich um eine Lehrstelle als Industriekauffrau bei der Fa. Hans Dorn, Baustoffwerke, Passau. Aufgrund einer Lehrzeitverkürzung konnte ich bereits im August 1977 die Kaufmannsgehilfenprüfung vor der Industrie- und Handelskammer Passau ablegen.

Von September 1977 an besuchte ich die Staatliche Berufsoberschule Passau, welche ich im Juli 1979 mit dem Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife verließ.

Im Wintersemester 1979/80 studierte ich an der Universität Regensburg Anglistik und Geographie für das Lehramt an Gymnasien. Für das Sommersemester 1980 bewarb ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität München für das Medizinstudium. Am 23. 03. 1982 bestand ich die ärztliche Vorprüfung, am 24. 03. 1983 das erste Staatsexamen und am 23. 08. 1985 das zweite Staatsexamen. Nach Beendigung meiner Ausbildung im Praktischen Jahr bestand ich am 07. 11. 1986 das dritte Staatsexamen. Die Approbation wurde mir am 24. 11. 1986 erteilt.









